

CUX1 对结直肠癌细胞增殖和转移的影响及机制研究

周京宇¹, 高红^{2,3}, 孙旭东¹, 黄小雨¹, 江涛^{2,3}, 宋军^{2,3}, 王建^{4*}

- (1. 徐州医科大学研究生院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院普外科, 江苏 徐州 221002;
3. 徐州医科大学消化病研究所, 江苏 徐州 221002;
4. 徐州矿务集团总医院(徐州医科大学附属第二医院)普外科, 江苏 徐州 221006)

摘要: **目的** 探讨 CCUT 样同源盒 1(CUX1)对结直肠癌细胞增殖与转移的影响及机制。 **方法** 利用 TCGA 数据库分析结直肠癌患者的癌组织和癌旁组织中 CUX1 的表达情况,通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 CUX1 在结直肠癌组织中的表达情况;利用 GEPIA 数据库分析 CUX1 表达对结直肠癌患者术后总体生存率的影响;利用 siRNA-NC 和 siRNA-CUX1 转染人结直肠癌细胞;CCK-8、Transwell 实验检测 CUX1 对结直肠癌细胞增殖与转移能力的影响;免疫印迹检测 CUX1 的干扰效率以及 CUX1、E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 蛋白的表达情况。 **结果** TCGA 数据库及 qRT-PCR 结果显示 CUX1 在结直肠癌组织中高表达($P < 0.05$);GEPIA 数据库结果显示 CUX1 低表达组的总体生存率明显优于高表达组($P < 0.01$);Transwell 实验结果显示 siRNA-CUX1 降低结直肠癌细胞的转移能力($P < 0.001$);CCK-8 实验结果显示 siRNA-CUX1 抑制结直肠癌细胞的增殖能力($P < 0.001$);免疫印迹检测结果显示转染 siRNA-CUX1 后结直肠癌细胞的 CUX1、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达降低,E-cadherin 蛋白表达升高($P < 0.05$)。 **结论** 干扰 CUX1 对结直肠癌细胞的增殖和转移能力有抑制作用。

关键词: 结直肠癌;CUX1;增殖;转移

中图分类号: R735.3⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3882(2021)11-0787-05

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2021.11.002

Effects of CUX1 on the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells and related mechanism

ZHOU Jingyu¹, GAO Hong^{2,3}, SUN Xudong¹, HUANG Xiaoyu¹,
JIANG Tao^{2,3}, SONG Jun^{2,3}, WANG Jian^{4*}

- (1. Graduate School, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002; 3. Institute of Digestive Diseases, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002; 4. Department of General Surgery, the General Hospital of Xuzhou Mining Group/the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221006)

Abstract: Objective To investigate the effect of CUX1 gene on the proliferation and metastasis of colorectal cancer and related mechanism. **Methods** The expression of CUX1 in cancer and adjacent normal tissues of colorectal cancer patients was analyzed using TCGA database. The expression of CUX1 in colorectal cancer tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The GEPIA database was used to analyze the effect of CUX1 expression on the overall survival rate of patients with colorectal cancer after surgery. Furthermore, siRNA-NC and siRNA-CUX1 were transfected into human colon cancer cells. CCK-8 assay and Transwell assay were used to detect the effects of CUX1 on the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. The interference efficiency of CUX1 and the expression of E-cadherin, Vimentin and N-cadherin proteins were detected by Western blot. **Results** According to TCGA database and qRT-PCR, CUX1 was highly expressed in colorectal cancer tissues ($P < 0.05$). The results of GEPIA database showed that the overall survival rate of the low CUX1

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073133);江苏省卫生健康委医学科研重点 A 类项目(ZDA2020005);江苏省自然科学基金面上项目(BK20191154);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSW-050);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX20_0928)

* 通信作者, E-mail: 15005206620@163.com

expression group was significantly better than that of the high expression group ($P < 0.01$). Transwell assay showed siRNA-CUX1 reduced the metastatic ability of colorectal cancer cells ($P < 0.001$). CCK-8 assay showed that siRNA-CUX1 inhibited the proliferation of colorectal cancer cells ($P < 0.001$). Western blot showed that the expression of CUX1, N-cadherin and Vimentin in colorectal cancer cells decreased but the expression of E-cadherin increased after siRNA-CUX1 transfection ($P < 0.05$). **Conclusions** Knockdown of CUX1 can inhibit the proliferation and metastasis of colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; CUX1; proliferation; metastasis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 目前是全球男性中第三大癌症类型, 女性中第二大癌症类型, 2012 年有 140 万新病例, 超过 690 000 例死亡^[1]。目前, 随着癌症生物学标志物、结肠镜、腹腔镜手术和放疗化疗等技术的发展, 患者的治疗选择有所增加, 但过去 20 年中 CRC 的存活率并未得到实质性改善, 并且转移性结肠癌的 5 年生存率仍低于 10%。其中复发、转移和化疗耐药是治疗失败的最常见原因^[2]。因此, 为了实现早期诊断和更好的预后, 有必要研究结直肠癌的新型生物学标志物和治疗靶点。

CCUT 样同源盒 1 (CUX1) 也称为 CCAAT 置换蛋白 (CDP) 或 Cut-like (CUTL1), 位于染色体带 7q22.1 上, 属于同源域 (HD) 转录因子家族, 具有 4 个相似的 DNA 结合域结构, 包括一个 CUT 同源域和 3 个 CUT 重复序列 (CR1、CR2、CR3)。最初, CUX1 被认为仅在胚胎组织中表达, 并参与胚胎发育和细胞分化^[3]。目前, CUX1 被认为是单倍体不足的肿瘤抑制因子, 但在一些肿瘤细胞中又反常过表达, 如多发性骨髓瘤、子宫平滑肌瘤、乳腺癌、胰腺癌、黑色素瘤和神经胶质瘤^[4-10]。虽然已有 CUX1 在其他癌症中发生、发展机制的报道, 但其在结直肠癌中的作用机制及生物学功能鲜见相关文献报道。本研究通过构建 CUX1 小干扰 RNA (siRNA) 转染细胞模型, 结合体外实验探究其对结直肠癌细胞增殖与转移能力的影响。

1 资料与方法

1.1 标本 选取 2019 年 6 月—2020 年 9 月徐州医科大学附属医院胃肠外科手术切除的 30 例结直肠癌组织和配对的癌旁组织, 于液氮中保存。

1.2 实验材料 人结直肠癌细胞 DLD1 和 LOVO (中国科学院细胞库); RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶消化液 (美国 Gibco 公司)。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试剂盒 (诺唯赞公司); SiLentFect™ Lipid Regent (美国 Bio-Rad 公司); siRNA-CUX1: 5'-CCGGCGGCAAGGAGC-

CATTTCCACTCGAGTGTGAAATGGCTCCTTGCCGCTTTTGG-3' (吉玛公司); CCK-8 试剂盒 (江苏凯基生物技术公司); Transwell 小室 (镇江优化生物公司); CUX1 抗体、E-cadherin 抗体 (美国 CST 公司); N-cadherin、Vimentin 抗体 (北京博奥森公司); GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物公司)。

1.3 数据库处理与分析 从 TCGA 数据库中提取结直肠癌组织与癌旁组织 CUX1 水平的相关资料, 由 MD Anderson Cancer Center 对其进行标准化预处理。筛选出癌旁组织 41 例, 癌组织 471 例, M0 期结直肠癌组织 416 例, M1 期 81 例, 随后通过 R 语言对其进行后续分析。利用 GEPIA 在线数据库的结直肠癌数据集验证 CUX1 的表达水平与预后的关系。

1.4 细胞培养 结直肠癌细胞 LOVO 和 DLD1 复苏后, 加入含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 当细胞密度达到 90% 以上后, 使用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化、离心, 之后按 1:3 的比例进行传代培养。

1.5 siRNA 转染 当细胞密度达到 30%~50%, 使用 siLentFect™ Lipid Reagent 进行转染。对照组加入 siRNA-NC, 实验组加入 siRNA-CUX1, 转染 6 h 后, 用含有 10% FBS 的培养基更换旧培养基, 继续培养 48 h 后, 收集细胞进行后续实验。

1.6 Transwell 实验 细胞转染 48 h 后, 胰酶消化, 离心收集细胞并计数, 将细胞 (8×10^4 个/孔) 接种到上室中。将含有 20% FBS 的培养基作为化学引诱剂置于下部腔室中。温育 24 h (迁移 48 h) 后, 用 90% 甲醇固定, PBS 洗涤 2 遍, 并用 0.3% 的结晶紫进行小室下表面的细胞染色, 洗净后用棉签除去小室上表面的细胞, 晾干后显微镜下 ($\times 100$) 随机选择 3 个区域, 对迁移的细胞进行计数。为了进行细胞侵袭实验, 在小室中加入 Matrigel 基质胶, 于 5% CO₂、37℃ 培养箱中凝固 2 h, 之后同迁移实验步骤。

1.7 CCK-8 实验 细胞转染 48 h 后, 胰酶消化, 离心收集细胞并计数, 把细胞接种于 96 孔板中 (密度为 4×10^3 个/孔), 培养 6 h 后细胞贴壁, 0、24、48、

72、96 h 后,将 CCK-8 溶液(10 μ l)和无血清培养基(100 μ l)混匀后加入每个孔中,在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h。随后使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值,该值指示培养基中增殖细胞的数量。

1.8 qRT-PCR 细胞转染 48 h 后,胰酶消化,离心收集细胞。使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA,将收集到的 RNA 反转录为互补 DNA(cDNA),然后使用 LightCycler96 仪器进行 qRT-PCR,以 18S 为内参检测 CUX1 mRNA 的相对表达量,通过相对定量($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)计算倍数变化。CUX1 引物序列:上游 5'-CGGCAAACAACCCGTTTCTT-3',下游 5'-CGCTTCTGGACTGCTCACT-3';18S 序列:上游 5'-GGAGTATGGTTGC111GCTGA-3',下游 5'-ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT-3'。

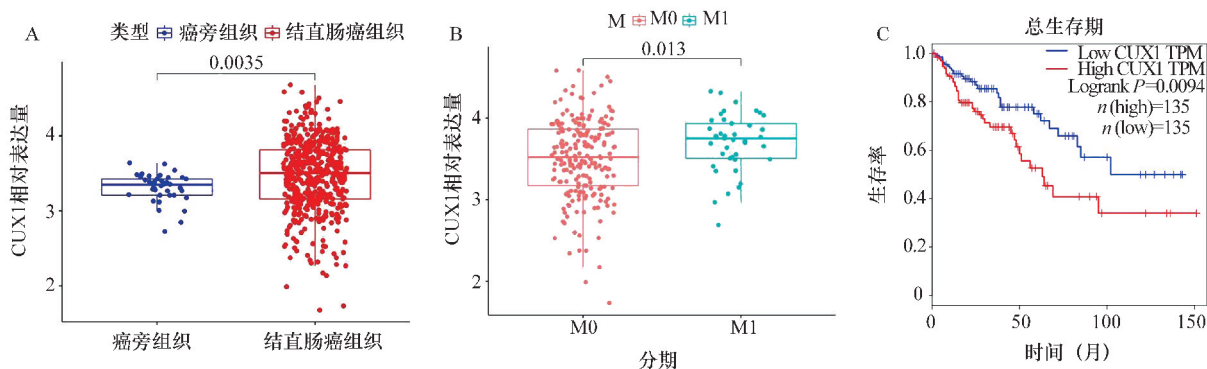
1.9 免疫印迹 细胞转染 48 h 后,用胰酶消化,离心收集细胞,PBS 洗涤 2 遍,再加入蛋白裂解液,超声破碎后提取蛋白,加入考马斯蓝测蛋白浓度,将蛋白配平,100 $^{\circ}$ C 煮蛋白 10 min,接着 100 V 电泳 2 h,110 V 电转 1 h,然后牛奶室温封闭 1 h,最后使用目标抗体(CUX1、E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、

GAPDH) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天, TBST 洗涤 5 min,6 次,加入羊抗兔/羊抗鼠二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 5 min,6 次,之后在暗室用 1:1 配好的 ECL 曝光液将膜上的免疫复合物可视化, Image J 软件分析其灰度值,目的蛋白与内参(GAPDH)比值为其相对表达量。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, GraphPad, Prism. 7. 0. 4 作图。计量资料以均值 \pm 标准差表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA、GEPIA 数据库中 CUX1 基因的表达情况及其与临床预后的关系 TCGA 数据库中 CUX1 在结直肠癌组织中的表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$),且在 M1 期结直肠癌患者中表达较高($P < 0.05$)。GEPIA 数据库显示 CUX1 低表达组的总体生存率明显优于高表达组($P < 0.01$)。见图 1。



A. TCGA 数据库显示 CUX1 在结直肠癌组织和癌旁组织中的表达差异; B. TCGA 数据库显示 CUX1 在 M0 与 M1 期结直肠癌患者中的表达差异; C. GEPIA 数据库显示 CUX1 表达情况与总生存期的关系

图 1 TCGA、GEPIA 数据库中结直肠癌患者 CUX1 的表达情况及其与总生存期的关系

2.2 CUX1 在结直肠癌组织中的表达情况 结直肠癌组织中 CUX1 表达量显著高于癌旁组织, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 CUX1 对结直肠癌细胞转移能力的影响 与对照组相比, siRNA-CUX1 可抑制 LOVO、DLD1 结直肠癌细胞的侵袭、迁移能力, 差异具有统计学意义($P < 0.001$)。见图 3。

2.4 CUX1 对结直肠癌细胞增殖能力的影响 与对照组相比, siRNA-CUX1 可抑制 2 种结直肠癌细胞的增殖能力, 差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 4。

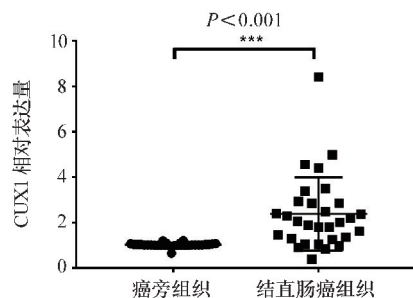
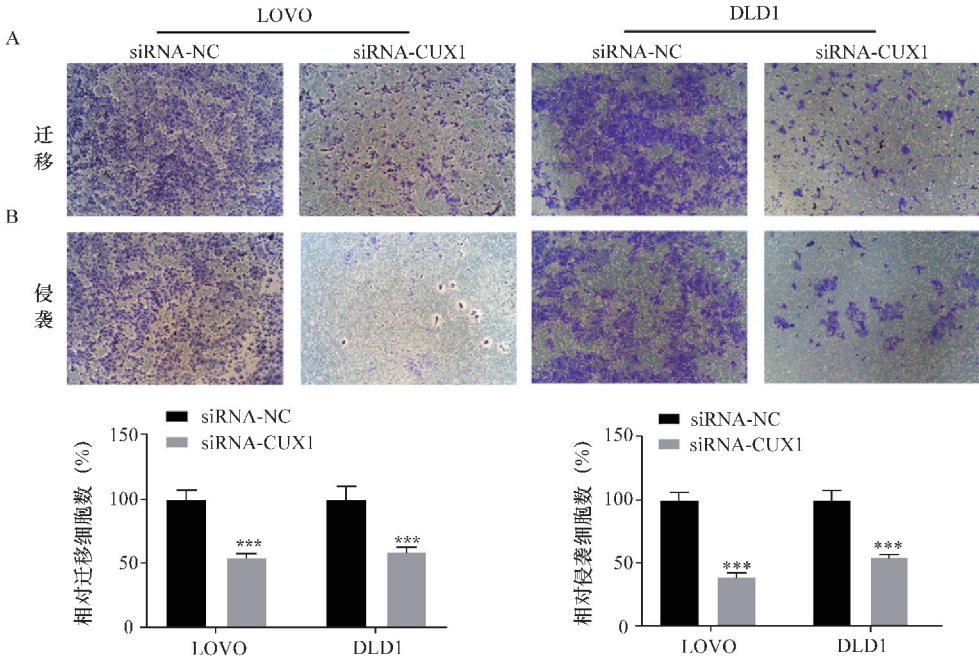
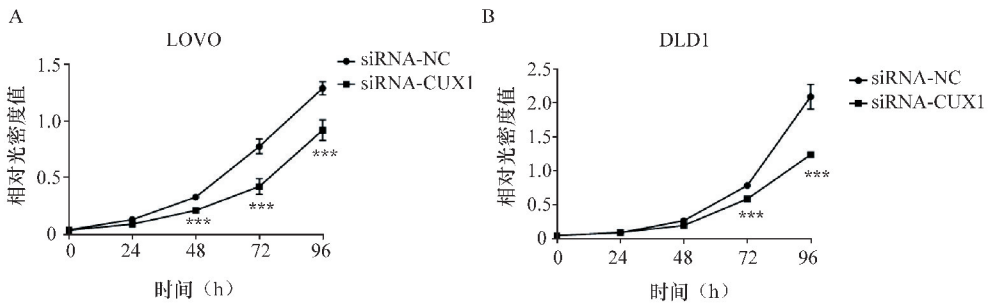


图 2 qRT-PCR 检测结直肠癌组织及其癌旁组织 CUX1 的表达情况



A. Transwell 实验检测 CUX1 敲低后对 LOVO、DLD1 细胞迁移能力的影响;B. Transwell 实验检测 CUX1 敲低后对 LOVO、DLD1 细胞侵袭能力的影响;与 siRNA-NC 组比较:*** $P < 0.001$

图 3 CUX1 对结直肠癌细胞迁移、侵袭能力影响(结晶紫染色, $\times 100$)

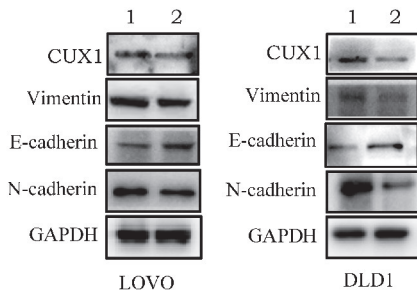


A. CCK8 检测敲低 CUX1 后对 LOVO 细胞增殖的影响;B. CCK8 检测敲低 CUX1 后对 DLD1 细胞增殖的影响;与 siRNA-NC 组比较:*** $P < 0.001$

图 4 CUX1 对结直肠癌细胞增殖能力的影响

2.5 免疫印迹检测上皮间质转化(EMT)相关标记蛋白表达情况 与对照组相比,siRNA-CUX1 使 2 种结直肠癌细胞 E-cadherin 蛋白表达明显升高(P

< 0.05),CUX1、N-cadherin、Vimentin 蛋白明显降低($P < 0.05$)。因此敲低 CUX1 可抑制结直肠癌细胞发生 EMT。见图 5。



1. siRNA-NC; 2. siRNA-CUX1

图 5 免疫印迹检测 siRNA-CUX1 对结直肠癌细胞 EMT 相关标志蛋白表达的影响

3 讨论

CUX1 属于同源域转录因子家族,在胚胎和神经系统发育、细胞增殖、细胞周期调控、细胞分化进程和 DNA 损伤修复等方面发挥重要作用^[3]。近来研究发现 CUX1 在介导肿瘤进展中具有重要作用,既作为肿瘤细胞迁移和侵袭的刺激因子,也作为药物诱导的凋亡抑制剂^[4-10]。在胰腺癌中过表达 CUX1 抑制细胞凋亡^[11],在胶质瘤中 CUX1 可通过 circ-CUX1/EWSR/MAZ 通路轴促进神经母细胞瘤的增殖及侵袭^[12]。本研究通过 TCGA 数据库发现 CUX1 在结直肠癌组织中高表达,又通过 GEPIA 数据库发现 CUX1 高表达组预后较差,因此推测 CUX1 可能参与结直肠癌发生、发展过程。我们通过 CCK-8、Transwell 实验检测 CUX1 对结直肠癌细胞增殖和转移能力的影响,结果发现敲低 CUX1 后,结直肠癌细胞的迁移、侵袭及增殖能力下降。

EMT 是一种将上皮细胞转化为间充质细胞表型的生物过程。在 EMT 期间,细胞连接蛋白被下调,顶端-基底极性丢失,促使上皮样细胞向间质细胞形态转变^[13]。上述所有过程都将允许细胞迁移、侵袭,抵抗细胞凋亡和重塑细胞外基质 (ECM),从而促进癌细胞从原发肿瘤部位向周围组织和远处器官的转移、扩散。此外,研究也已证实 CUX1 能够通过 PI3K 通路激活 EMT 过程进而促进膀胱癌细胞的增殖和转移^[14]。Fei 等^[15]在胶质瘤细胞中同样发现,CUX1 能够介导 EMT 途径,参与肿瘤细胞的迁移和侵袭。结合体外细胞实验,我们利用 siRNA 敲低 CUX1 的表达,发现 EMT 通路中的关键蛋白 Vimentin 和 N-cadherin 表达增加,而 E-cadherin 表达降低,这提示 CUX1 很可能通过 EMT 途径参与结直肠癌的转移。

本研究证明 CUX1 在结直肠癌中过度表达,且通过激活 EMT 来促进结直肠癌的转移。因此,作为癌基因,CUX1 可成为结直肠癌诊断和治疗的潜在靶点。

参考文献:

[1] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-164.

[2] Buccafusca G, Proserpio I, Tralongo AC, et al. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care[J]. *Crit Rev*

Oncol Hematol, 2019, 136: 20-30.

[3] Ramdzan ZM, Nepveu A. CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(10): 673-682.

[4] Wu X, Feng F, Yang C, et al. Upregulated expression of CUX1 correlates with poor prognosis in glioma patients: a bioinformatic analysis[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(4): 527-537.

[5] De Vos J, Thykjaer T, Tarte K, et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays[J]. *Oncogene*, 2002, 21(44): 6848-6857.

[6] Moon NS, Rong Zeng W, Premdas P, et al. Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas[J]. *Int J Cancer*. 2002, 100(4): 429-432.

[7] Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, et al. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(6): 521-532.

[8] Ripka S, Neesse A, Riedel J, et al. CUX1: target of Akt signaling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer[J]. *Gut*, 2010, 59(8): 1101-1110.

[9] Fan X, Wang H, Zhou J, et al. The transcription factor CUTL1 is associated with proliferation and prognosis in malignant melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2014, 24(3): 198-206.

[10] Wu X, Feng F, Yang C, et al. Upregulated expression of CUX1 correlates with poor prognosis in glioma patients: a bioinformatic analysis[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 69(4): 527-537.

[11] Krug S, Kühnemuth B, Griesmann H, et al. CUX1: a modulator of tumour aggressiveness in pancreatic neuroendocrine neoplasms[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(6): 879-890.

[12] Li H, Yang F, Hu A, et al. Therapeutic targeting of circ-CUX1/EWSR1/MAZ axis inhibits glycolysis and neuroblastoma progression [J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(12): e10835.

[13] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.

[14] Wang ZY, Shang J, Li ZQ, et al. PIK3CA is regulated by CUX1, promotes cell growth and metastasis in bladder cancer via activating epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 536072.

[15] Fei Y, Xiong Y, Shen X, et al. Cathepsin L promotes ionizing radiation-induced U251 glioma cell migration and invasion through regulating the GSK-3β/CUX1 pathway[J]. *Cell Signal*, 2018, 44: 62-71.

收稿日期: 2021-08-11 修回日期: 2021-11-01

本文编辑: 李昕